

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑲ Anmeldenummer: **83105114.9**

⑤① Int. Cl.³: **C 25 B 3/04**
C 07 H 19/20

⑳ Anmeldetag: **24.05.83**

③① Priorität: **05.06.82 DE 3221339**

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
21.12.83 Patentblatt 83/51

⑧④ Benannte Vertragsstaaten:
CH DE FR GB IT LI

⑦① Anmelder: **BASF Aktiengesellschaft**
Carl-Bosch-Strasse 38
D-6700 Ludwigshafen(DE)

⑦② Erfinder: **Steckhan, Eberhard, Dr.**
Jungholzweg 26
D-5309 Meckenheim(DE)

⑦② Erfinder: **Wienkamp, Rainer**
Am alten Schuetzenhof 26
D-4400 Muenster(DE)

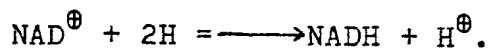
⑤④ **Verfahren zur elektrochemischen Hydrierung von Nicotin-amidadenin-dinucleotid.**

⑤⑦ **Verfahren zur elektrochemischen Hydrierung von Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD[⊕]) zu NADH in wäßriger Lösung und in Gegenwart einer Metallkomplexverbindung als Elektronenüberträger.**

Verfahren zur elektrochemischen Hydrierung von Nicotin-
amidadenin-dinucleotid

5 Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur elektro-
chemischen Hydrierung von Nicotinamidadenin-dinucleotid
(NAD^{\oplus}).

10 NAD^{\oplus} spielt bekanntlich im Organismus bei vielen unter De-
hydrierungen und Hydrierungen verlaufenden enzymatischen
Prozessen die Rolle des Wasserstoffüberträgers. Bei Redox-
reaktionen reagiert das Coenzym $\text{NAD}^{\oplus}/\text{NADH}$ dabei in folgen-
der Weise:



15 Zahlreiche Enzyme und Mikroorganismen sind in der Lage, in
Gegenwart von NADH die Reduktion ungesättigter Verbindun-
gen zu bewirken. Diese Reduktionen, bei denen NADH wie
beschrieben als Coenzym wirkt, haben bei einer großen Sub-
stratbreite den Vorteil einer hohen Stereospezifität. Es
20 ist deshalb wünschenswert, diese vorteilhafte Wirkungs-
weise für eine gewerblich anwendbare Reduktion ungesättig-
ter Verbindungen, insbesondere zur Herstellung chiraler
Moleküle heranzuziehen. Eine derartige Möglichkeit läßt
sich jedoch nur dann wirtschaftlich realisieren, wenn das
25 bei der Reduktion entstandene NAD^{\oplus} auf einfache Weise zu
 NADH regeneriert werden kann.

30 Reduziert man NAD^{\oplus} elektrochemisch zu NADH , so werden bei
-1,1 Volt, bezogen auf die Kalomelelektrode, im wesent-
lichen enzyminaktive Dimere gebildet. Da auch bei einem
sehr negativen Potential von -1,8 Volt, bezogen auf die
Kalomelelektrode, das NADH neben unwirksamen Dimeren und

35 Hee/P

Isomeren nur in 50 %iger Ausbeute gebildet wird, kommt die direkte elektrochemische Reduktion für die Regenerierung von NAD^{\oplus} praktisch nicht in Betracht.

- 5 Man hat deshalb schon vorgeschlagen, das NAD^{\oplus} durch eine indirekte elektrochemische Reduktion zu regenerieren, bei der man die Elektrolyse in Gegenwart eines Elektronenüberträgers und eines zusätzlichen Enzyms, das die Elektronenübertragung auf das Coenzym NAD^{\oplus} katalysiert, durchführt.

10

So werden in Angew. Chem. 98 (1981) 897, in J. Org. Chem. 46 (1981) 4622 sowie in J. Org. Chem. 46 (1981) 4100 Verfahren beschrieben, bei denen man als Elektronenüberträger Methylviologen oder trans-4,5-Dihydroxy-1,2-dithian verwendet. Diese Methoden haben jedoch den Nachteil, daß die zur Katalyse der Elektronenübertragung notwendigen Enzyme empfindlich, schwer zu reinigen und nur mit aufwendigen Methoden zu isolieren sind.

15

- 20 Es wurde nun gefunden, daß man die elektrochemische Hydrierung von Nicotinamidadenin-dinucleotid (NAD^{\oplus}) zu NADH in wässriger Lösung und in Gegenwart eines Elektronenüberträgers erheblich vorteilhafter durchführen kann, wenn man als Elektronenüberträger Metallkomplexverbindungen verwendet.

25

Besonders geeignet sind Metallkomplexverbindungen mit einem Reduktionspotential nicht negativer als -1,3 Volt, vorzugsweise nicht negativer als -0,9 Volt, bezogen auf die

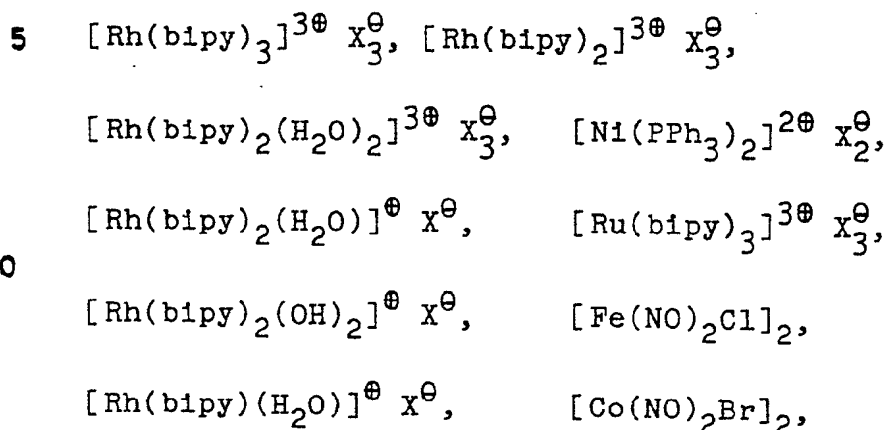
30

Ag/AgCl-Elektrode. Metallkomplexverbindungen der genannten Art enthalten als Zentralatom z.B. Rh^{I} , Rh^{III} , Ru^{I} , Ru^{III} , Ir^{I} , Ir^{III} , Fe^{II} , Fe^{0} , Ni^{II} , Ni^{0} , Co^{III} , Co^{I} und als Liganden z.B. 2,2'-Bipyridin, 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin, 1,10-Phenanthrolin, 2,2',6',2-Terpyridin, Tetra-

35

azamakrocyclen, ein Porphyrin, ein Phthalocyanin oder NO.

Von diesen Metallkomplexverbindungen, von denen solche mit organischen Liganden bevorzugt sind, seien im einzelnen folgende Verbindungen genannt: Aquocobalamin.



15 in denen X ein Anion, z.B. Cl bedeutet.

Das neue elektrochemische Verfahren wird vorzugsweise in einer geteilten Zelle bei Temperaturen bis zu 70°C, zweckmäßig bei 10 bis 50°C und einem pH von 5 bis 10 durchgeführt. Als Elektroden wird ein für Elektrosynthesen übliches Elektrodenmaterial verwendet. So sind z.B. Kathoden aus Metallen, wie Blei, Kupfer, Eisen und Nickel oder Graphit und Anoden aus Platin oder Graphit geeignet. Die Stromdichten betragen z.B. 1 bis 100 mA/cm². Das Kathodenpotential beträgt z.B. bis zu -1,3 Volt und liegt vorzugsweise zwischen -0,5 bis -0,9 Volt, bezogen auf die Ag/AgCl Elektrode.

Die Elektrolyse wird in wässriger Lösung durchgeführt, wobei die Lösungen, z.B. auch Lösungsvermittler, das sind mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel, z.B. Alkohole, wie Methanol und Ethanol oder Ether, wie Dioxan oder Dimethoxyethan enthalten können.

Beispielsweise wird die Umsetzung in einer wässrigen Lösung von Tris-HCl-Puffer durchgeführt, das sind Lösungen von

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, die durch Zugabe von Salzsäure auf den gewünschten pH-Wert eingestellt werden.

Man führt die elektrochemische Hydrierung von NAD^{\oplus} mit Hilfe der genannten Elektronenüberträger zweckmäßig in Gegenwart der ungesättigten Verbindung, die durch das regenerierte NADH reduziert werden soll, sowie in Gegenwart solcher Enzyme durch, welche die Reduktion der ungesättigten Verbindungen durch NADH katalysieren.

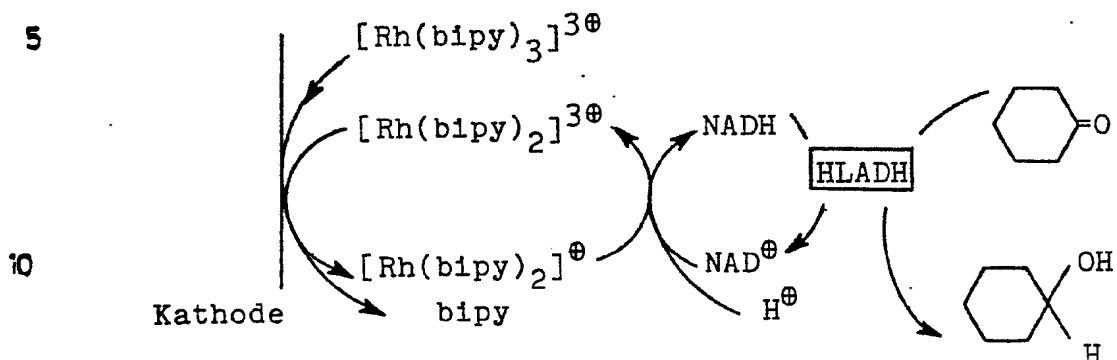
Geeignete ungesättigte Verbindungen sind z.B. Ketone, wie Cyclohexanon, Methyl- oder Ethylcyclohexanon, 2-Norbornanon, Bicyclo[3.2.1]-2-octanon oder Acetophenon, sowie Aldehyde, Ketocarbonsäuren oder Verbindungen mit -C=C- -Doppelbindungen.

Geeignete Enzyme sind z.B. alle bekannten NADH- und NADPH (Nicotinamidadenin-dinucleotidphosphat)-abhängigen Oxido-Reduktasen, das sind Alkoholdehydrogenasen, wie HLADH (Horse-liver-alkohol-dehydrogenase), oder Aminosäuredehydrogenasen.

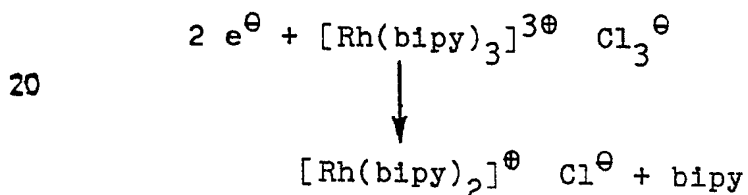
Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren läßt sich die elektrochemische Hydrierung von NAD^{\oplus} zu NADH besonders vorteilhaft durchführen. So wird z.B. die Bildung von Dimeren des NAD^{\oplus} weitgehend verhindert. Außerdem kann man das Verfahren auch in Abwesenheit von Enzymen durchführen, die man bei den bisher bekannten Methoden zugesetzt hat, um die Elektronenübertragung auf das NAD^{\oplus} zu katalysieren.

In den folgenden Beispielen wird das erfindungsgemäße Verfahren am Beispiel der indirekten elektrochemischen Reduktion von NAD^{\oplus} zu NADH mit Hilfe von $\text{Rh}(\text{bipy})_2^{\oplus}$ als Elektronenüberträger veranschaulicht, wobei als zu reduzierende Verbindung Cyclohexanon verwendet wird, das in Gegenwart des Enzyms HLADH (Horse-liver-alkohol-dehydro-

genase) in Cyclohexanol übergeführt wird. Die dabei im Kathodenraum stattfindenden Reaktionen sind aus dem folgenden Schema ersichtlich:



Der Elektronenüberträger Tris[2,2'-bipyridyl]-rhodium-tri-
chlorid geht dabei entsprechend der folgenden Gleichung
durch Aufnahme von Elektronen an der Kathode in das Bis-
[2,2'-bipyridyl]-rhodium-chlorid über



Beispiele

25

Die Elektrolyse wurde in einer geteilten Elektrolysezelle mit einer Graphit-Kathode der Oberfläche 6 cm², einer Platin-Anode und einer Glasfritte als Diphagma bei Raumtemperatur, einem pH von 9 und einem Potential von -950 mV, bezogen auf eine Ag/AgCl-Elektrode durchgeführt. Als Referenz-Elektrode diente eine Ag/AgCl-Elektrode in gesättigtem wässrigen Kaliumchlorid.

Als Anolyt wurde eine 0,1 molare Lösung von Tris-HCl-Puffer in Wasser verwendet, die mit konzentrierter Salz-

7
säure auf einen pH-Wert von 9 eingestellt wurde. Der Katholyt enthielt als Stammlösung die gleiche Lösung wie der Anolyt sowie die in der folgenden Tabelle angegebenen Mengen an $\text{Rh}(\text{bipy})_3\text{Cl}_3$, NAD^\oplus , Cyclohexanon und HLADH.

5

Die Elektrolyseapparatur wurde vor Zugabe des Cyclohexanons mit Argon gespült und während der Elektrolyse unter einer Argonatmosphäre belassen. Die Stromstärke betrug anfänglich 10 bis 20 mA.

10

Bei den Beispielen 1 und 2 wurde diskontinuierlich gearbeitet, d.h. es wurde erst nach der indirekten elektrochemischen Hydrierung des NAD^\oplus zu NADH das Enzym HLADH und Cyclohexanon zum Katholyten gegeben und anschließend das

15

Cyclohexanol bestimmt. Bei der kontinuierlichen Arbeitsweise gemäß den Beispielen 3, 4 und 5 wurde die Elektrolyse in Gegenwart von HLADH und von Cyclohexanon durchgeführt und das Cyclohexanol gaschromatographisch bestimmt.

20

Die Einsatzzahlen und Ergebnisse sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich:

25

30

35

Tabelle

Beil- spiel	IRH('bipy') ₂ CT-3 mg (mmol)	NAD ⁺ mg (mmol)	Cyclohexanon mg (mmol)	HLADH mg (mmol)	Cyclohexanol mg (mmol)	Anzahl der Cyglen + NAD ⁺ /NADH Rh ³⁺ /Rh ⁺
1	384 (0,5)	332 (0,5)	59 (0,6)	2,0 (2,4x10 ⁻⁵)	25 (0,25)	0,5
2	230 (0,3)	398 (0,6)	73,5 (0,75)	2,0 (2,4x10 ⁻⁵)	29 (0,29)	0,5
3	115 (0,15)	100 (0,15)	96 (0,98)	1,1 (1,3x10 ⁻⁵)	33 (0,33)	2,2
4	307 (0,4)	133 (0,2)	171 (1,74)	3,9 (4,6x10 ⁻⁵)	42 (0,42)	1,0
5	192 (0,25)	66,5 (0,1)	110 (1,12)	2,0 (2,4x10 ⁻⁵)	29 (0,29)	1,1

((Ein Cyclus ist jeweils abgeschlossen, wenn das eingesetzte NAD⁰ einmal zum NADH regeneriert wurde))

Patentansprüche

1. Verfahren zur elektrochemischen Hydrierung von Nicotin-
amid-adenin-dinucleotid (NAD^{\oplus}) zu NADH in wäßriger
Lösung und in Gegenwart eines Elektronenüberträgers,
dadurch gekennzeichnet, daß man als Elektronenüber-
träger Metallkomplexverbindungen verwendet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
man Metallkomplexverbindungen mit einem Reduktions-
potential nicht negativer als -1,3 Volt, bezogen auf
die Ag/AgCl-Elektrode, verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
man Metallkomplexverbindungen mit organischen Liganden
verwendet.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
man solche Metallkomplexverbindungen verwendet, die
als Zentralatom Rh^{I} , Rh^{III} , Ru^{I} , Ru^{III} , Ir^{I} , Ir^{III} ,
 Fe^{II} , Fe^{O} , Ni^{II} , Ni^{O} , Co^{III} , Co und als Liganden 2,2'-
-Bipyridin, 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin, 1,10-Phen-
anthrolin, 2,2',6',2"-Terpyridin, Tetraazamakrocyclen,
ein Porphyrin, ein Phthalocyanin oder NO enthalten.

30

35

W



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0096288
Nummer der Anmeldung

EP 83 10 5114

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. ³)
P, X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 97, Nr. 21, 22. November 1982, Seite 436, Nr. 178215q, Columbus, Ohio, USA R. WIENKAMP et al.: "Indirect electrochemical processes. Pt. 13. Indirect electrochemical regeneration of NADH by using a bipyridine-rhodium(I) complex as electron carrier" & ANGEW. CHEM. 1982, 94(10), 786 * Zusammenfassung *	1-4	C 25 B 3/04 C 07 H 19/20
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, Band 89, Nr. 25., 18. Dezember 1978, Seite 187, Nr. 210588m, Columbus, Ohio USA M.A. JENSEN et al.: "Effect of Lewis acids on the electrochemical reduction of nicotinamide adenine dinucleotide" & BIOELECTROCHEM. BIOENERG. 1978, 5(2), 388-400 -----		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. ³) C 25 B
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 06-09-1983	Prüfer GRUNDKE H.H.
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			